

**1/34/2 (Item 1 from file: 351)**

009782178      \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1994-062031/ 199408

**Disulphide cpd for accurately determining thiol - is eg****2,2'-dinitrosobenzene disulphide**

Patent Assignee: TERUMO CORP (TERU )

Number of Countries: 001    Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6016619	A	19940125	JP 91159998	A	19910603	199408 B

Priority Applications (No Type Date): JP 91159998 A 19910603

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6016619	A	6	C07C-323/09	

JP 6016619      A      6 C07C-323/09

Abstract (Basic): JP 6016619 A

Disulphide cpd. is new, where R1-R4 are H, halogen atom, alkyl gp., alkoxy gp., aryl gp., nitro gp., sulphonie acid gp., carboxyl gp., or amino gp.; among R1 to R4 gps., adjacent gps. to each other may form a condensed ring.

A method for quantitative determination of thiol, which comprises allowing thiol to react with the disulphide cpd. (I), then allowing the resultant ortho-nitrosophenyl to form chelate with a metal ion to cause coloration., the metal ion being pref. zinc, nickel, cobalt or iron ion, is also new.

USE/ADVANTAGE - (I) provides a reagent, method, material and device for detecting thiol with a high sensitivity and accuracy easily and promptly, without using an expensive equipment and poisonous reagent.

In an example, in 1500 ml of ethanol were dissolved 60.1g of Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O (250 mmol) and 8.02g (250 mmol) of powdery sulphur. The soln. was refluxed for 10 mins. under heating. To the reaction mixt. was added 100g (494 mmol) of o-bromonitrobenzene. The mixt. was refluxed for further 1 hr. The reaction mixt. was cooled to room temp., to which was added 100 ml of water. Resulting ppte. was collected by filtration and washed with cold ethanol and water, followed by drying under reduced pressure to give 70.1g of 2,2'-dinitrobenzenedisulphide. In 1000 ml of 80% ethanol was dissolved 50g (162 mmol) of 2,2'-dinitrobenzene disulphide. To the soln. was added 45g (688 mmol) of zinc powder, and the mixt. was stirred vigorously. To the mixt. was added 400 ml of a 10% aq. soln. of ammonium chloride slowly through a dropping funnel. The reaction mixt. was stirred for further 2 hrs. at 45 deg.C, which was subjected to filtration. The residue was washed with 500ml of hot water. The filtrate and the washing was combined, to which was added 1 kg of ice. The reaction vessel was cooled on an ice-bath. To the reaction mixt. mixt. was added 20ml of conc. sulphuric acid while stirring. To the mixt. was added promptly a soln. of 50g (167 mmol) of potassium dichromate in 100 ml of water. The mixt. was stirred for 3 mins. vigorously, which was subjected to filtration. To the filtrate was added 1500 ml of ether for extraction. The ether layer was washed with 30% sodium hydrogencarbonate, then with a satd. soln. of sodium chloride, followed by concn. under reduced pressure to give 23g of a crude prod. The crude prod. was purified by means of a silica gel column chromatography eluting with methylene chloride to afford 20g of the object cpd. 2,2'-dinitrosobenzene disulphide.

Dwg.0/0

Derwent Class: E14; E19; J04; S03.

International Patent Class (Main): C07C-323/09

International Patent Class (Additional): C07C-323/19; C07C-323/35;

C07C-323/66; G01N-031/22

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-16619

(43)公開日 平成6年(1994)1月25日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 C 323/09		7419-4H		
323/19		7419-4H		
323/35		7419-4H		
323/66		7419-4H		
G 0 1 N 31/00	P	7906-2J		

審査請求 未請求 請求項の数 6(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-159998

(22)出願日 平成3年(1991)6月3日

(71)出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 川西 徹朗

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72)発明者 浅井 裕之

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54)【発明の名称】 ジスルフィド化合物、およびそれを用いたチオール測定材料、ならびにチオール定量方法

(57)【要約】 (修正有)

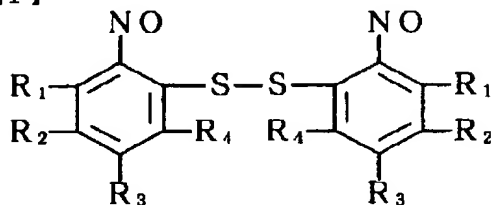
【構成】 ジスルフィド化合物。および、前記ジスルフィド化合物と金属塩または金属イオンを用いる、チオール定量測定法、測定材料、ならびに前記測定材料を用いたチオール測定器具。

【効果】 本発明に係わるジスルフィド化合物は、容易な操作で迅速に、高価な機器や有毒な試薬を用いることなく、しかも高感度、高精度でチオールを検出するための試薬、方法、材料、器具を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の化1に示されるジスルフィド化合物。

## 【化1】



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、アリール基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシル基及びアミノ基から選ばれる基を示し、 $R_1 \sim R_4$ のうち隣接する基は縮合環を形成していても良い。)

【請求項2】 請求項1に記載のジスルフィド化合物、金属塩を有効成分とするチオール測定材料。

【請求項3】 金属塩が、銅、亜鉛、ニッケル、コバルト、鉄の塩である請求項2に記載のチオール測定材料。

【請求項4】 チオールと請求項1に記載のジスルフィド化合物とを反応させ、生成されたオルトニトロソチオフェノールを、金属イオンによりキレート形成させ呈色させることによりチオールを定量する方法。

【請求項5】 金属イオンが、銅、亜鉛、ニッケル、コバルト、鉄のイオンである請求項5に記載のチオールを定量する方法。

【請求項6】 請求項2および3に記載のチオール測定材料を備えた測定器具。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なジスルフィド化合物、該ジスルフィド化合物および金属塩を有効成分とするチオールの測定材料、およびそれを用いた定量方法、測定器具に関する。

## 【0002】

【従来の技術】チオールはSH基を持つ化合物の総称であり、生体成分中に広く存在する。チオールの測定は、タンパク中の硫黄含量の測定や酵素活性の間接的測定等の生化学的分野や、悪臭測定等の環境及び衛生化学的分野において重要である。

【0003】従来一般的なチオールの定性検出法としては、ヨウ素-アジドの分解反応による検出、銅塩の沈殿による検出、加水分解後の硫化水素としての検出等が行われて来た。

【0004】またチオール定量法としては、電流滴定による方法、水銀メルカプチドの生成による方法、ヨウ素や銅による酸化滴定、臭素滴定、テトラヒドロホウ酸ナトリウム法、マーキュリーオレンジ法等がある。

【0005】ところが、これらの定性定量反応のほとんどは複数の試薬を要し、操作が繁雑である、反応時間を

要する、感度が悪い等の問題点がある。

【0006】その後、高感度で容易な操作でしかも定量精度の良いチオール検出剤として、チオールと直接特異的に反応して呈色変化をきたすジスルフィド型化合物やベンツヒドロール型化合物が用いられるようになってきた。

【0007】ジスルフィド型検出剤の反応原理を、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を例に説明すると、測定対象のチオール( $R-SH$ )が検出試薬のジスルフィド結合を攻撃し、チオール量に応じて5-メルカプト-2-ニトロ安息香酸が生成され、その吸光度を測定することによって定量を行う。

【0008】しかし、この方法は呈色が黄色の為、例えば目視で半定量を行う場合には読み取りにくく、検体溶液中の着色物の影響をも受け易い。また、より良い感度も要求されている。

【0009】ベンツヒドロール型検出剤の反応原理を、4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ベンツヒドロール(以下、BDC-OHと略す)を例に説明すると、BDC-OHが測定系に存在する酸によって極大吸収波長606 nmの青色のカチオンとなり、測定対象のチオールはこれと反応し、無色の複合体を生じる。すなわち、606 nmの吸光度の減少を測定することによって、チオールを定量する。

【0010】この方法は、感度的には前述のジスルフィド型よりやや優れており、呈色も青色である為目視でも判別し易い。

【0011】しかし、チオールが出現することにより退色する反応である為、陰性で呈色、陽性で無色となり概念的に捕らえにくい。また、チオール基がカチオン中心に求核攻撃するメカニズムである為、チオール以外に求核性官能基を有する化学種は反応速度の差はあれ、妨害物質となる可能性がある。

## 【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、容易な操作で迅速に、高価な機器や有毒な試薬を用いることなく、しかも高感度、高精度でチオールを検出する為の試薬、方法、材料、器具を提供するものである。

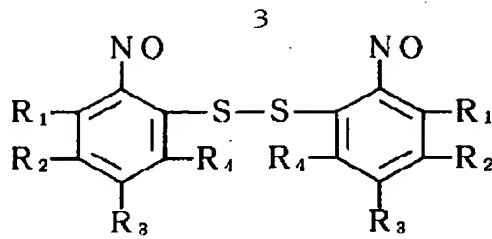
## 【0013】

【課題を解決するための手段】上記目的は、以下の本発明により達成される。

【0014】① 下記の化2で示されるジスルフィド化合物。

## 【0015】

## 【化2】



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、アリール基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシル基及びアミノ基から選ばれる基を示す。 $R_1 \sim R_4$ のうち隣接する基は縮合環を形成していても良い。)

② 化2に示されるジスルフィド化合物及び金属塩を有効成分とするチオール測定材料。

【0016】③ チオールと①に記載のジスルフィド化合物とを反応させ、生成されたオルトニトロソチオフェノールを、金属イオンによりキレート形成させ呈色させることによりチオールを定量する方法。

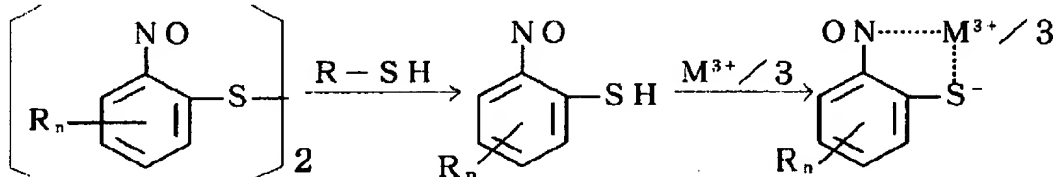
【0017】④ ②に記載のチオール測定材料を備えた測定器具。

【0018】

【発明の構成】本発明のジスルフィド化合物は以下の方法で合成される。

【0019】すなわち、該当するオルトハロニトロベンゼン誘導体を出発物質とし、 $Na_2S_2$ と反応させてハロゲン位置のジスルフィド化を行った後、ニトロ基を亜鉛等の金属でヒドロキシルアミンに還元し、さらに重クロム酸等でニトロソ基へ酸化する。

【0020】本発明によるチオール定量方法で用い得る金属は、オルトニトロソチオフェノール誘導体とキレート形成し呈色するものであれば何れでも良いが、好ましくは銅、亜鉛、ニッケル、コバルト、鉄が用いられ、単一で使用してもあるいは2種以上を組み合わせ使用しても良い。また、測定材料、測定器具とする場合、これらの金属イオンは塩の形で与える。解離性の塩であればどのようなものでも良いが、特に金属ハロゲン化合物が好ましい。これらの金属化合物は好ましくはジスルフィド化合物の0.3～1の比率で用いられる。



本発明に係る化2に示されるジスルフィド化合物において、 $R_1 \sim R_4$ で示される置換基の違いによって、呈色波長、及びジスルフィド結合の切断され易さ、すなわち呈色感度に影響する。水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシル基、アリール基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシル基及びアミノ基のどの置換基を有

10

20

30

\*

※

50

4

\*【0021】実際のチオールの測定は、検体、ジスルフィド化合物及び金属イオンを適当な溶媒中で反応させた後、溶液の色調変化を目視ないし透過吸光度の測定によって読み取る。反応溶媒としては検体と全ての成分を溶解せしめる物であれば何れでも用いるが、水、アルコール、アセトン及びこれらの混合溶媒等が用いられる。場合によっては、緩衝剤、界面活性剤等の反応補助剤を添加することにより、より高い感度や正確な測定結果が得られる場合がある。例えば、反応系に緩衝剤を添加したり、反応溶媒に緩衝液を使用することによって、検体のpHの影響を受けにくく、より精度の高い測定値が得られる。また、検体成分やジスルフィド化合物が反応溶液に溶解しにくい場合、界面活性剤の添加により反応がよりスムーズに進行する。

【0022】反応は溶液中で行う他、反応に必要な成分を担体に吸着させた試験具を用いることによって、測定に要する操作がより簡便となる。この場合、検体溶液中に試験具を含浸させた後、試験具の色調変化を目視ないしは表面の反射吸光度の測定によって読み取る。この方法は尿検体等のルーチン検査に有効である。吸着性担体としては、濾紙、布帛や有機又は無機の多孔質素材が用いられ、反応に必要な成分を適当な溶媒に溶解せしめ担体に含浸後、乾燥によって溶媒を除去することによって製造される。

【0023】

【作用】本発明に係る化2に示されるジスルフィド化合物は下記化3に示すように、測定対象であるチオールによってそのジスルフィド結合が選択的に切断され、オルトニトロソチオフェノールを生成する。

【0024】この化合物自身は無色あるいは黄色しか持たないが、銅、亜鉛、ニッケル、コバルト、鉄等のオルトニトロソチオフェノール誘導体とキレート形成する金属とキレート形成し赤～青色に呈色する。このキレート化合物の吸光度を測定、あるいは目視で読み取ることによってチオール量を知る事ができる。

【0025】

【化3】

※していてもチオールを検出することが可能であるが、以下の置換基導入により各々の性質を付与することが可能である。

【0026】例えばニトロ基等の電子吸引性基の導入は、生成するオルトニトロソチオフェノールのチオールアニオンを安定化する為、ジスルフィド結合の切断性を

向上させる。また、呈色波長を高波長へシフトしたり、吸光係数を向上させる働きもある。スルホン酸基、カルボキシル基、アミノ基等イオン性基の導入はジスルフィド化合物を水溶性化する効果が有り、生体成分の測定系に特に有効である。

【0027】さらに縮合環を用いた場合も呈色波長の高波長化や吸光係数の向上につながる。ニトロソナフタレンジスルフィド化合物は単環化合物より良い呈色を示すことが明らかとなっている。

【0028】以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

【0029】

【実施例1】

ジスルフィド化合物の合成

① 2, 2'-ジニトロベンゼンジスルフィド

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  60.1g (250mmol) と硫黄粉末 8.02g (250mmol) をエタノール 1500ml に溶解し、10分加熱還流した。それに、o-ブロモニトロベンゼン 100g (495mmol) を加えさらに1時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却後、水 100ml を加え、析出する沈殿を濾過し、さらに沈殿を冷エタノール、水で洗浄した。この固体を減圧乾燥し、生成物 70.1g を得た。

【0030】② 2, 2'-ジニトロソベンゼンジスルフィド

2, 2'-ジニトロベンゼンジスルフィド 50g (162mmol) を 80% エタノール 1000ml に溶解し亜鉛末 45g (688mmol) を加え、激しく攪拌する。攪拌を続けながら、10% 塩化アンモニウム水溶液 400ml を滴下漏斗よりゆっくり加える。反応混合物を 45℃ に保ち、そのまま 2 時間攪拌を続ける。反応混合物を濾過し、残渣をさらに 500ml の熱水で洗浄する。ろ液と洗液を合わせたものに氷 1kg を加え、反応容器を氷浴にて冷却する。良く攪拌しながら濃硫酸 20ml を添加し、さらに重クロム酸ナトリウム 50g (167mmol) を水 100ml に溶解した溶液を素早く加える。混合物を 3 分間激しく攪拌した後、ろ液にエーテル 1500ml を加え抽出を行う。エーテル層は、30% 重炭酸ナトリウム、飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、粗生成物 23g を得た。これを、塩化メチレンを溶離液とするシリカゲルカラムクロマトで精製し、20g の目的物を得た。構造は MS、NMR、IR にて確認した。

【0031】[スペクトルデータ]

MS [M/z]: 276 ( $\text{M}^+$ ), 216 ( $\text{M}^+ - 2\text{NO}$ ), 138 ( $\text{M}^+ / 2$ ),  
NMR [ppm]: 7.80-8.80 (aromatic),

IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1505 (NO)。

【0032】他のニトロソベンゼンジスルフィド誘導体も、出発物質に該当する置換ハロニトロベンゼンを使用することによって全く同様の方法で合成される。

【0033】試みたジスルフィド化合物と収率、スペクトルデータを下記に示す。

【0034】③ ジチオビス(4-メトキシ-2-ニトロソベンゼン)

収率: 42%、

MS [M/z]: 336 ( $\text{M}^+$ ), 276 ( $\text{M}^+ - 2\text{NO}$ ), 168 ( $\text{M}^+ / 2$ ),  
NMR [ppm]: 3.70 ( $\text{OCH}_3$ ), 7.30-8.20 (aromatic),

IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1505 (NO)。

【0035】④ ジチオビス(4-アセチル-2-ニトロソベンゼン)

収率: 38%、

MS [M/z]: 360 ( $\text{M}^+$ ), 300 ( $\text{M}^+ - 2\text{NO}$ ), 180 ( $\text{M}^+ / 2$ ),  
NMR [ppm]: 2.40 ( $\text{COCH}_3$ ), 7.50-8.20 (aromatic),  
IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1505 (NO), 1730 ( $\text{C}=\text{O}$ )。

【0036】⑤ 2, 2'-ジチオビス(4-メトキシ-2-ニトロソナフタレン)

収率: 53%

MS [M/z]: 376 ( $\text{M}^+$ ), 316 ( $\text{M}^+ - 2\text{NO}$ ), 188 ( $\text{M}^+ / 2$ ),  
NMR [ppm]: 7.70-8.50 (aromatic),  
IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1505 (NO)。

【0037】

【実施例2】

チオールを検出

200mM ボラックス-塩酸緩衝液 (pH=6.0) 100ml 中に本発明に関わる 15mM ジスルフィド化合物のエタノール溶液 10ml、10mM  $\text{NiCl}_2$  水溶液 10ml を加えた試薬溶液を調整した。この試薬溶液 1ml に 1mM チオフェノール溶液 0.1ml を加え、室温で 2 分間攪拌反応させた後、透過吸光度の測定を行った。測定は分光光度計 U-2000 (日立製作所製) を用いて行った。コントロールとして、チオールを含有しないエタノールを用いて同様の実験を行った。また、対照実験として検出試薬に 5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を用いて同様の実験を行った。結果を表 1 に示す。

【0038】

【表1】

チオール検出試薬	極大吸収 波長 (nm)	透過吸光度	
		チオフェノール	コントロール
2,2'-ジニトロソベンゼン ジスルフィド	540	1.564	0.176
ジチオビス(4-メトキシ- 2-ニトロソベンゼン)	545	1.645	0.135
ジチオビス(4-アセチル- 2-ニトロソベンゼン)	620	1.778	0.293
2,2'-ジチオビス (1-ニトロソナフタレン)	721	1.613	0.184
5,5'-ジチオビス(2-ニトロ- 安息香酸) [対照実験]	412	1.047	0.092

表1から明らかなように、対照と比較して明らかに高い感度が得られており、色調も赤色～青色～緑色と目視判別し易い可視領域に極大吸収波長があった。

【0039】

【実施例3】

チオール定量実験

200mMボラックス-塩酸緩衝液(pH=6.0)1

00ml中に15mM2,2'-ジチオビス(1-ニトロソナフタレン)のエタノール溶液10ml、10mM\*

\*NiCl<sub>2</sub>水溶液10mlを加えた試薬溶液を調整した。この試薬溶液1mlに種々の濃度のチオフェノール溶液0.1mlを加え、室温で2分間攪拌反応させた後、721nm透過吸光度の測定を行った。測定は分光光度計U-2000(日立製作所製)を用いて行った。チオフェノール濃度と得られた透過吸光度の値を表2に示す。

【0040】

【表2】

チオフェノール濃度	透過吸光度	チオフェノール濃度	透過吸光度
0mM	0.184	0.8mM	1.332
0.2mM	0.473	1.0mM	1.613
0.4mM	0.742	2.0mM	2.845
0.6mM	1.056	4.0mM	4.726

表2から明らかなように、チオールの定量性が確認された。

【0041】

【実施例4】

チオール測定器具による定量

濾紙(アドバンテックNo.514A)を、1mMNi

Cl<sub>2</sub>を含有する200mMボラックス-塩酸緩衝液

(pH=6.0)に含浸し、60℃で50分通風乾燥した。

更にこの濾紙を、本発明に係わるジスルフィド化合物

0.4mM、1%エチレングリコールモノヘキシルエ※50

※-テルを含有するアセトン溶液に含浸し、40℃で20分通風乾燥した。これを、5×5mm角に切断し、両面テープを用いて厚さ0.2mmのポリスチレン製のシートに固定した。得られたチオール測定試験具に、0.01mMチオフェノールエタノール溶液を滴下して1分後の呈色変化を試験紙表面の反射吸光度を測定することにより観察した。測定は大塚電子製のMCPD-200を用いて測定した。コントロールとして、チオールを含有しないエタノールを用いて同様の実験を行った。また、対照実験として検出試薬に5,5'-ジチオビス(2-

ニトロ安息香酸)を用いて同様の実験を行った。結果を \*【0042】  
表3に示す。 \* 【表3】

チオール検出試薬	極大吸収 波長 (nm)	反射吸光度	
		チオフェノール	コントロール
2,2'-ジニトロソベンゼン ジスルフィド	540	0.623	0.158
ジチオビス(4-メトキシ- 2-ニトロソベンゼン)	545	0.753	0.142
ジチオビス(4-アセチル- 2-ニトロソベンゼン)	620	0.798	0.181
2,2'-ジチオビス (1-ニトロソナフタレン)	721	0.644	0.102
5,5'-ジチオビス(2-ニトロ- 安息香酸)      【対照実験】	412	0.310	0.135

表3に示すように、容易な操作でチオールが定量できる  
試験具が得られた。呈色波長は可視領域にある為、目視  
でも非常に判定が容易である。

【0043】

【発明の効果】実施例2～4で示されるように、本発明  
に係わるジスルフィド化合物は、チオールと反応し、金 30  
属塩または金属イオンとキレートを形成し呈色されるこ  
とから、チオールの定量測定に有効であり、また、それ※

※を用いた測定器具は容易な操作でチオールが定量ができ  
る。

【0044】したがって本発明に係わるジスルフィド化  
合物は、容易な操作で迅速に、高価な機器や有毒な試薬  
を用いることなく、しかも高感度、高精度でチオールを  
検出する為の試薬、方法、材料、器具を提供するもので  
ある。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 31/22

識別記号

1 2 2

庁内整理番号

7906-2J

F I

技術表示箇所